Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 1, Spring 2019, p. 111-119

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۱۱۹-۱۱۱

توالی یابی و بررسی بیوانفورماتیکی ایجاد توالی هدف ریز RNA های سرکوب گر در 3' UTR ژن میوستاتین برخی گوسفندان بومی ایران

سعیده سلیمانی[۱]- محمدهادی سخاوتی[۲]- علی جوادمنش [۲*]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۹

چکیده

میوستاتین، به‌عنوان عامل تنظیم‌کننده منفی رشد ماهیچه‌های اسکلتی در پستانداران شناخته‌شده است. ثابت‌شده است که برخی از جهش‌های طبیعی موجود در ژن میوستاتین، به علت اثر منفی بر بیان این ژن باعث افزایش رشد و عضلانی شدن گونه‌هایی مانند گاو، گوسفند، موش و سگ می‌شود. می‌توان با استفاده از این الگوهای جهش و استفاده از مهندسی ژنتیک، حیوانات مزرعه‌ای تراریخت با سرعت رشد بالاتر تولید کرد. در این تحقیق قسمتی از ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین، به طول ۲۱۸۰ جفت باز در ۱۵ رأس از نژادهای گوسفند دالاق، بلوچی و زل تعیین توالی شد. سپس توالی‌ها با هدف بررسی وجود جهش‌ها و همچنین محل هدف ریز RNA ها بررسی و نسبت به ایجاد تغییر *in silico* در ناحیه تعیین توالی شده برای ایجاد توالی هدف ریز RNA های miR-1 و miR-206 که در سرکوب ژن میوستاتین و افزایش رشد بافت عضله نقش دارند اقدام شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که کلیه گوسفندان این مطالعه فاقد جهشی مؤثر در تغییر بیان ژن میوستاتین بودند. با ایجاد تغییر *in silico* در دو جایگاه به‌صورت هدفمند، نسبت به ایجاد دو توالی هدف برای ریز RNA های miR-1 و miR-206 اقدام شد. بررسی بیوانفورماتیکی مشخص کرد که این جهش‌ها دارای اثرات قابل پیش‌بینی جانبی نبودند و به همین علت، می‌توان در آینده از این جهش‌ها برای دستکاری ژنتیکی با روش ویرایش ژنوم و ایجاد فنوتیپ عضلانی در گوسفندان تراریخت بومی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بافت عضله، گوسفند، میوستاتین و ریز RNA.

مقدمه

بالغ‌بر ۲۷ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند در حال حاضر، تولید گوشت مهم‌ترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (۱۵، ۲۱). شناسایی ژن‌های مؤثر در تولید یکی از اولویت‌های مهم در استراتژی‌های اصلاح دام است و تاکنون ژن‌های کاندید متعددی مرتبط با تولید شیر و گوشت، ایمنی و سایر صفات اقتصادی در دام‌های اهلی شناخته‌شده است (۲، ۱۴، ۲۲).

ژن میوستاتین توسط پژوهشگران به‌عنوان ژن کاندیدا برای تولید گوشت در نژادهای مختلف حیوانات مزرعه‌ای موردبررسی قرارگرفته است، این ژن در گونه گوسفند بر روی کروموزوم شماره ۲ واقع‌شده است. میوستاتین، عضوی از خانواده TGF-ß[۳] است و به‌عنوان عامل تمایز و رشد (GDF8)[۴] شناخته‌شده است و همچنین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی رشد ماهیچه‌های اسکلتی است و در صورت عدم بیان، می‌تواند نقش کلیدی در افزایش رشد عضله و کیفیت گوشت دارد (۱۰، ۱۸، ۲۵). تحقیقات انجام‌شده در جوندگان، انسان و دام تشخیص داده‌شده است که وجود برخی جهش‌های طبیعی در ژن میوستاتین باعث کاهش بیان ژن و یا مهار عملکرد این ژن می‌شوند که این جهش‌ها در توالی ژن میوستاتین باعث از دست دادن عملکرد ژن و درنتیجه افزایش توده عضلانی می‌شوند و این فنوتیپ تولیدشده به‌عنوان عضله مضاعف شناخته‌شده است (۵، ۱۱، ۲۶). ازجمله جهش‌های طبیعی، تبدیل نوکلوتید گوانین به آدنین در موقعیت ۶۷۲۳ در ژن میوستاتین (g+6723G>A) است (۹) که باعث افزایش رشد

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(*-نویسنده مسئول: (E-mail: javadmanesh@um.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.v11i1.67295

3- Transforming growth factor (TGF)-β superfamily
4- Growth and Differentiation Factor-8

عضله و کاهش چربی لاشه در گوسفند تکسل[1] بلژیکی می‌شود. این نژاد از گوسفند به علت افزایش وزن نسبتاً بالا و وزن‌های تولد و از شیرگیری بالا برای پرواربندی بسیار مناسب است و به‌صورت ترمینال کراس در آیخته های تجاری به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۵). این جهش به‌صورت طبیعی در 3' UTR[2] ژن میوستاتین به وجود آمده و منجر به ایجاد جایگاه هدف جدید برای ریز RNA های miR-1 و miR- 206 شده است (۷، ۹). نقش ریز RNA ها miR-1 و 206 -miR در افزایش رشد بعضی از گونه‌های حیوانی مانند موش نیز به اثبات رسیده است که باعث افزایش توده عضله در این گونه شده است (۱۹). ریز RNA ها گروهی از RNA های غیرکد کننده با طول حدود ۲۲ نوکلئوتید هستند، این مولکول‌ها در طی تکامل حفظ شده‌اند که نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها بعد از رونویسی ایفا می‌کنند (۴، ۲۴). توالی هدف برای ریز RNA ناحیه مرکزی[3] نامیده می‌شود، جفت شدن این ناحیه با قسمتی از 3' UTR در mRNA ژن هدف باعث تجزیه و یا عدم ساخت mRNA و درنتیجه جلوگیری از روند ترجمه می‌گردد (۱). یکی از روش‌هایی که می‌توان ژن میوستاتین را در حیوانات مزرعه‌ای غیرفعال نمود و باعث بهبود رشد عضله در این گونه‌ها شد ویرایش ژنوم[4] است که ابزاری فعال و کارآمد برای دست‌کاری دقیق ژنوم می‌باشد و دارای توانایی زیاد برای اصلاح ژنوم گونه‌های دام می‌باشد (۸). اخیراً پیشرفت‌های عمده‌ای در ویرایش ژنوم با توسعه روش‌های TALENs و CRISPR-Cas9[5] به وجود آمده است این روش با دقت و راندمان بالا انجام می‌شود و منجر به به‌وجود آمدن موجودات جهش‌یافته و تراریخته شده است (۲۳). از تکنولوژی ویرایش ژنوم برای اولین بار با تزریق TALEN و ZFN در سلول زیگوت خوک برای ویرایش ژنوم در خوک‌ها استفاده شده است (۱۶). همچنین با استفاده از این روش در هر دو گونه گاو و گوسفند، ژن میوستاتین ویرایش شد. در اثر آن جهش موثری در ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین این گونه‌ها ایجاد شد که درنهایت باعث غیرفعال شدن این ژن و ایجاد فنوتیپ عضله مضاعف در این گونه‌ها شده است (۸). انتقال این جهش با استفاده از روش‌های مرسوم آمیخته گری امکان‌پذیر است ولی به علت اینکه همراه این جهش سایر ژن‌ها نیز منتقل می‌شوند باید انتظار داشت که سایر ژن‌ها نیز منتقل شوند که این امر منجر به تغییر سایر ویژگی‌های ظاهری، تولیدی و صفاتی از قبیل سازگاری با محیط خواهد شد. بنابراین از مزایای استفاده از این روش علاوه بر افزایش سرعت اصلاح نژاد نسبت به روش آمیخته گری سنتی می‌توان به حفظ سازگاری محیطی گوسفندان بومی نیز اشاره کرد.

هدف از این تحقیق توالی یابی 3' UTR ژن میوستاتین در گوسفندان دنبه‌دار و نیم دنبه بلوچی، دالاق و زل به منظور ایجاد جهش مناسب با استفاده از روش *in silico* برای ایجاد جایگاه هدف برای miR-1 و miR-206 در 3' UTR ژن میوستاتین بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، خون‌گیری به‌طور تصادفی از ۱۵ رأس گوسفندهای نر و ماده نژاد دالاق، بلوچی و زل انجام شد و سپس به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت Prime Prep (شرکت GeNeT Bio، کره جنوبی) انجام شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و پلیت ریدر اپیوک (BioTek, USA) موردبررسی قرار گرفت. برای تکثیر قطعه ۲۱۸۰ جفت بازی 3' UTR ژن میوستاتین با کد دسترسی (Oar_v3.1:CM001583.1) در پایگاه اطلاعاتی NCBI از سه جفت آغازگر استفاده شد (جدول ۱). آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5.0 طراحی شدند و هر جفت به ترتیب برای تکثیر ناحیه ابتدایی (۷۲۱ جفت باز)، میانی (۶۳۵ جفت باز) و انتهایی (۱۰۵۸ جفت باز) ناحیه 3' UTR استفاده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)[6] برای تکثیر قطعه موردنظر با شرایط دمایی واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، تعداد ۳۵ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌منظور اتصال آغازگرها به DNA به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت یک ساعت استفاده شد. خالص‌سازی محصولات PCR توسط روش رسوب با اتانول[7] انجام شد (۱۴). تعیین توالی نمونه‌ها پس از خالص کردن کلیه نمونه‌های حاصل از PCR توسط شرکت ماکروژن[8] (کره جنوبی) انجام گرفت. برای مقایسه و مطابقت توالی‌ها با یکدیگر و با توالی مرجع (Oar_v3.1:CM001583.1) از نرم‌افزار Sequence CLC Viewer 8.0 استفاده شد. ریز RNA ها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه پروتئین ممانعت به عمل می‌آورند. اتصال بین ریز RNA و mRNA هدف در جانوران در بیشتر موارد به 3'UTR مولکول mRNA هدف محدود می‌شود. پژوهش‌ها نشان

1- Texel
2 - 3' Untranslated Region
3 -Seed
4- Genetic editing
5- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein 9
6 - Polymerase chain reaction
7 -Ethanol precipitation
8 - Macrogene

می‌دهند که نوکلئوتیدهای ۲ تا ۸ از انتهای '5 مولکول ریـز RNA در ناحیه مرکزی با mRNA هدف مکمل می‌شوند و باعث توقف ترجمه mRNA هدف می‌شوند (۶). در این مطالعه نسبت به تغییر *in silico* الل G بـه A بـرای ایجـاد تـوالی‌هـای هـدف miR-1 و miR-206 (ACATTCCA) در گوسـفندان بـومی بـا الگـوبرداری از گوسـفند تکسل، اقدام و اثرات احتمالی حاصل از ایجاد این دو جهش بـه روش بیوانفورمـاتیکی بررسـی شـد. ابتـدا بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار CLC Sequence Viewer 8.0 توالی کامل ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند نژاد دالاق، زل و بلـوچی بـا تـوالی 3' UTR ژن میوسـتاتین گوسفند تکسل مقایسه شد و همچنین از لحاظ وجود نواحی تنظیمی و توالی‌های هدف ریز RNA های miR-1 و miR-206 مـورد بررسـی قرار گرفت. سپس بعد از تبدیل آلل G به الـل A، تـوالی 3'UTR ژن میوستاتین گوسفندان بومی مجدداً با استفاده از نرم‌افزار تارگت اسکن[1] (http://www.targetscan.org) مورد ارزیـابی واقـع شـد. در انتهـا وجود یا عدم وجود نواحی تنظیمی (موتیف ها) با استفاده از نـرم‌افـزار موتیـــف یـــاب[2] (http://www.genome.jp/tools/motif/motif) بررسی گردید.

نتایج و بحث

نتایج اسپکتروفتومتری و الکتروفورز DNA استخراج‌شده کیفیـت مناسب را نشان داد. قطعاتی از ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین به طول کلی ۲۱۸۰ جفت باز با واکنش زنجیـره‌ای پلـی‌مـراز و بـا اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصـی و برنامـه حرارتـی مناسـب، بـدون بانـد غیراختصاصی تکثیر شد (۱). مقایسه نتایج تعیـین تـوالی نمونـه‌هـای گوسفند نژاد دالاق، بلوچی و زل مورداستفاده در این تحقیق نشان داد که توالی این ناحیه در سه نژاد موردمطالعه از شـباهت بسـیار بـالایی برخوردار است و کلیه این نمونه‌ها دارای آلل طبیعی G بودنـد (شـکل ۲) و آلل جهش یافته A در نژادهای ایرانی مطالعه شده وجود نداشت. مطالعـات بسـیار کمـی در مـورد تـوالی یـابی ناحیـه 3' UTR ژن میوستاتین گوسفندان ایرانی وجود دارد. نتایج حاصل از این تحقیق بـا نتایج میار و همکاران (۲۰) که یـک ناحیـه ۱۰۰۳ جفـت بـازی از 3' UTR ژن میوستاتین نژادهای شال، زندی و زل را تعیین توالی کردند کاملا مطابقت داشت.

قبل از اعمال تغییر در ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند نژاد دالاق، بلوچی و زل، بررسی موتیف‌ها با استفاده از نرم‌افزار موتیف یاب نشان داد در ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین این نژادهـا هـیچ مـوتیفی که در پستانداران نقش تنظیمی داشته باشد، وجود ندارد.

نتایج به‌دست‌آمده از اعمال تغییر بـه روش *in silico* در 3'UTR ژن میوستاتین در این گوسفندان بومی نشان داد که هیچ تغییر خاصی در این توالی به وجود نمـی‌آیـد و تـوالی هـدف miR-1 و miR-206 (ACATTCCA) با موفقیت در 3'UTR ژن میوستاتین این نژادهای بومی ایجاد شد. همچنین به‌منظور اطمینان از عملکرد تنظیمی miR-1 و miR-206 دو توالی هدف ایجاد شد، یـک تـوالی هـدف miR-1 و miR-206 در نزدیک اگـزون شـماره سـه ژن میوسـتاتین و تـوالی هدف دیگر که به‌صورت جهش طبیعی در گوسفند تکسل اتفاق افتاده است، در یک قسمت دیگری از ژن میوستاتین گوسفندان اشـاره‌شـده ایجاد شد (شکل ۳). توالی‌های هدف ایجادشده بـا ایجـاد اخـتلال در عوامل آغازگر ترجمه و ناپایداری mRNA (۳)، به‌طـور کامـل باعـث مهار ترجمه ژن میوستاتین می‌شوند. پس از اعمال این تغییرات امکان به وجود آمدن نواحی تنظیمی جدید ناخواسته در اثر ایجاد این جهش‌ها با استفاده از نرم‌افزار موتیف یاب موردبررسـی قـرار گرفـت. نتـایج نشان داد ایجاد جهش‌های موردنظر منجر به ایجاد هیچ مـوتیفی کـه در پستانداران نقش تنظیمی داشته باشد نشد. همچنین نتایج حاصل از نرم‌افزار تارگت اسکن مشخص کرد که توالی هدف هـیچ ریـز RNA دیگری را تحت تأثیر قرار نداده است.

جهشی کـه در 3'UTR ژن میوسـتاتین گوسـفند تکسـل رخداده است مانع ترجمه ژن میوستاتین می‌شود و منجر به عضله مضـاعف و همچنین کاهش ذخیره چربی می‌گردد. بنابراین آلل جهش‌یافته A در 3'UTR ژن میوستاتین گوسفند تکسل به علت اثر بزرگی که بر روی فنوتیپ عضـله مضـاعف دارد مـی‌توانـد بـه‌عنـوان یکـی از بهتـرین نشانگرها برای بهبود ژنتیکی صفت رشد عضله باشد. درنتیجه انتخاب این آلل جهش‌یافته مـی‌توانـد سـودمندی قابـل‌ملاحظـه‌ای را بـرای پرورش‌دهندگان گوسفند به وجود آورد بنابراین می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی از این آلل جهش‌یافته A به‌عنوان یک الگـوی ژنتیکـی مناسب استفاده کرد (۹، ۱۲). بـا توجـه بـه تولیـد آزمایشـی و موفـق گونه‌های مختلف حیوانات مزرعه‌ای از قبیل گوسفند و گاو تراریخـت، که دارای ژن میوستاتین ویرایش شده هستند تا رشد بیشـتری داشـته باشند (۸، ۲۹)، در عمل نیز می‌توان بـا ایجـاد جهـش در ایـن ژن در سایر حیوانات مزرعه‌ای می‌تـوان نژادهـایی بـا تولیـد گوشـت بـالا و ضریب تبدیل پایین‌تر را تولید نمود. مزیت دیگر این روش نسـبت بـه روش تلاقی و دورگ گیری نژاد بومی با نـژادی ماننـد تکسـل، ایـن است که گوسفندان دنبه‌دار و بی دنبه (مثـل اکثـر نژادهـای اروپـایی) ازلحاظ طعم گوشت بسیار متفاوت بوده (۲۸) و گوشت گوسفند دنبه‌دار بیشتر موردپسند ذائقه مردم ایران می‌باشد؛ بنابراین بـا روش ویـرایش ژنوم، با حفظ اکثریت قریب‌به‌یقین ویژگی‌های مربـوط بـه سـازگاری محیطی گوسفند بومی، طعم گوشت نیز مطابق ذایقه حفظ خواهد شد. از طرفی ثابت‌شده است که این جهش روی ضریب تبدیل نیز مـؤثر و به‌صورت افزایشی باعث بهبود ضریب تبـدیل نیـز خواهـد شـد (۲۷).

1- Target scan
2- Motif finder

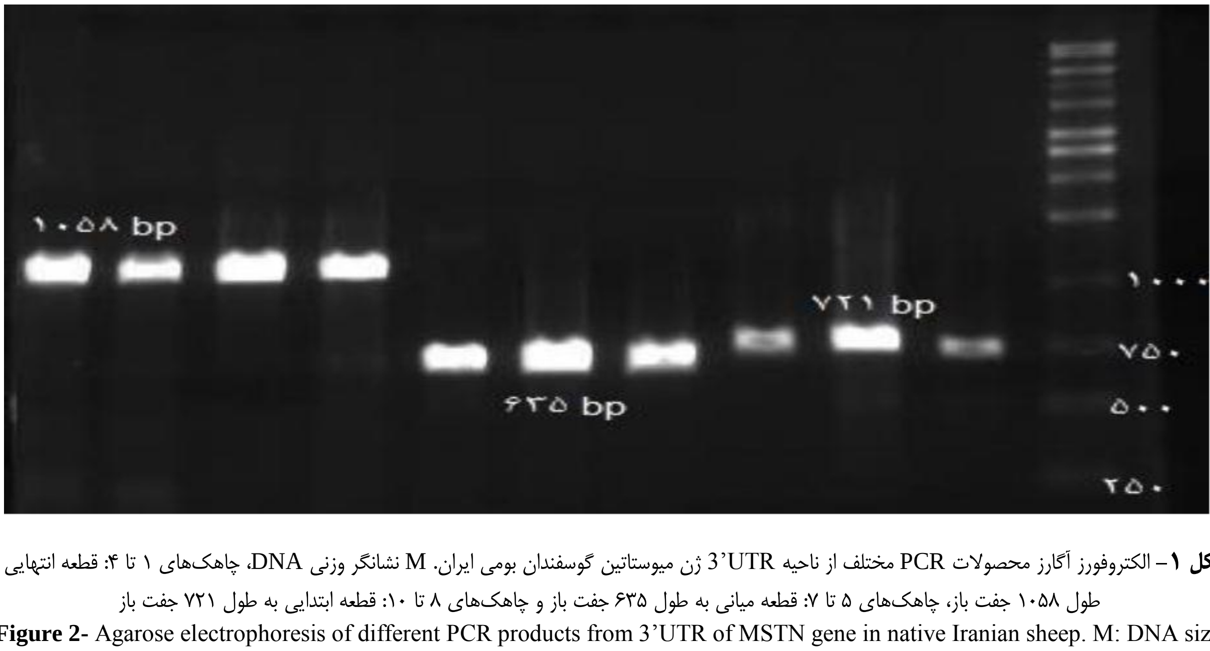
مطالعه مشابهی نیز در مورد گوسفند و ایجاد جهش در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین در سلول‌های فیبروبلاست و باهدف ایجاد فنوتیپ عضله مضاعف در آینده انجام‌شده است. در این ویرایش ژنوم موفقیت‌آمیز نیز از روش CRISPR/Cas9 استفاده شد (۳۰). بعد از بررسی و ساخت رده‌های سلولی ویرایش شده، در سال‌های بعد خرگوش (۱۷) و سگ (۳۱) با عضله مضاعف نیز علاوه بر حیوانات مزرعه‌ای تولید شدند. این تحقیقات موفق باعث گسترده شدن استفاده از این روش جهت به وجود آوردن فنوتیپ عضلانی در مقیاس گسترده در حیوانات در آینده نزدیک خواهد شد. می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی مدرن نیز با استفاده از ویرایش ژنوم، از این آلل جهش‌یافته به‌عنوان یک الگوی ژنتیکی مناسب جهت اصلاح گوسفندان بومی استفاده کرد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو

Table 1- The primers sequences of forward and reverse

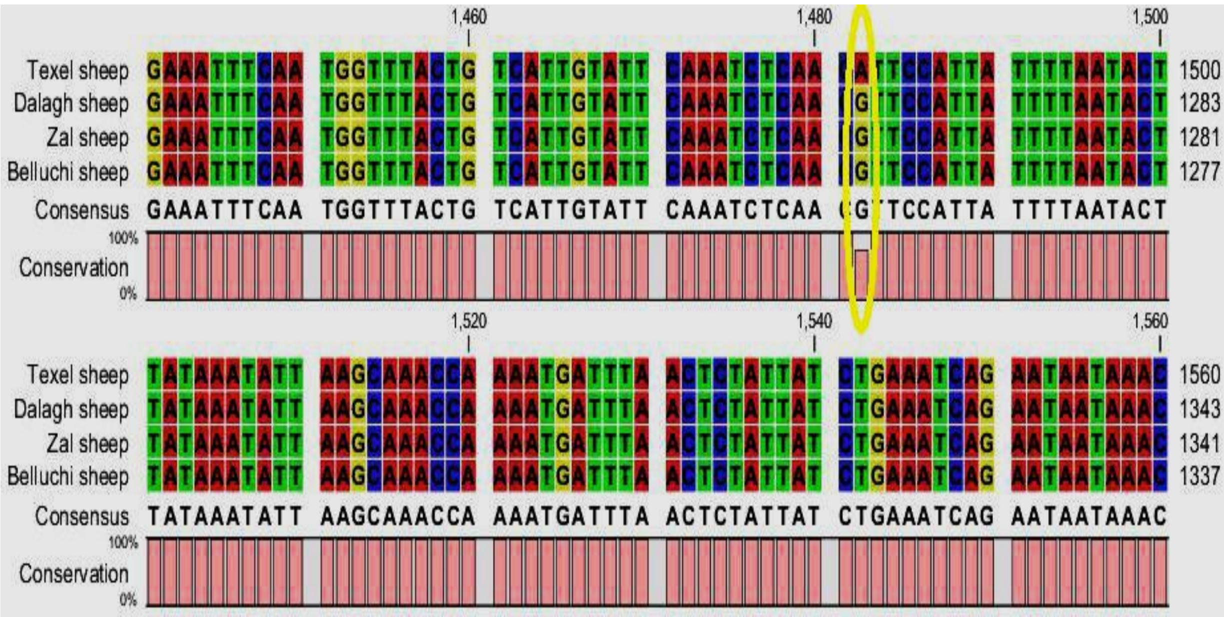
دمای اتصال **Annealing temperature**	توالی پرایمر **Primer sequences**	طول قطعه (جفت باز) **Fragment length (Base pair)**
58	F: 5'-GGCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGT-3'	721
	R: 5'-AAATCCATTGCCCATAGGGAGGA-3'	
58	F: 5'- AGTTTATGCCAATGGTGCTAATACA-3'	635
	R: 5'-CATTATACAGCCATCACGAACCC-3'	
58	F: 5'- CACTTATGGGTTCGTGATGGCTGT-3'	1058
	R: 5'-ATGTATAGCTCCAGCCTTGTCAGTG-3'	

M 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



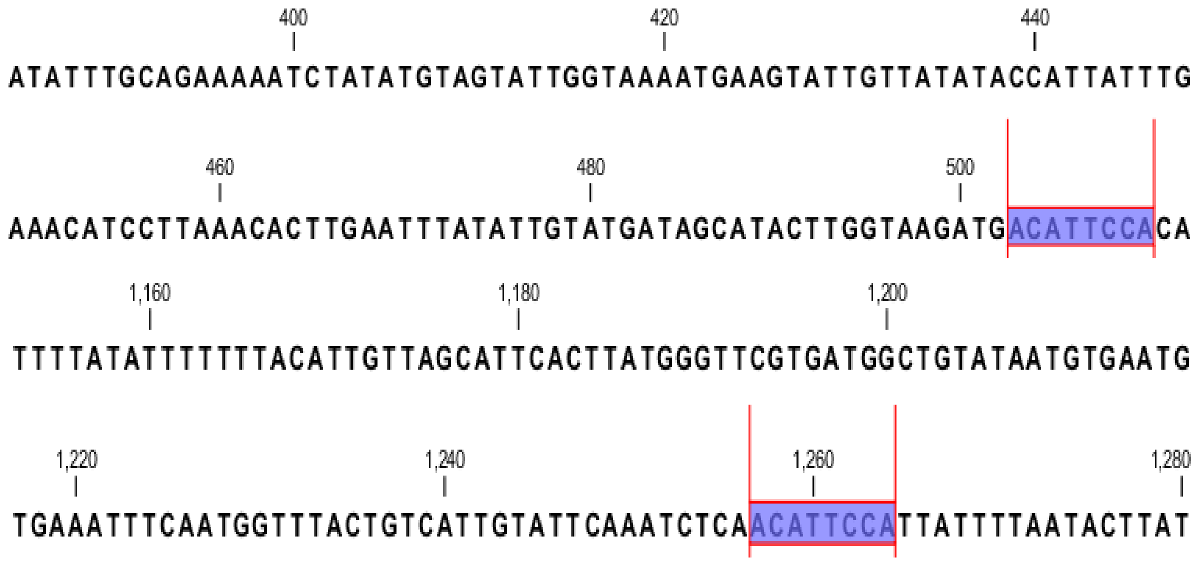
شکل ۱- الکتروفورز آگارز محصولات PCR مختلف از ناحیه 3’UTR ژن میوستاتین گوسفندان بومی ایران. M نشانگر وزنی DNA، چاهک‌های ۱ تا ۴: قطعه انتهایی به طول ۱۰۵۸ جفت باز، چاهک‌های ۵ تا ۷: قطعه میانی به طول ۶۳۵ جفت باز و چاهک‌های ۸ تا ۱۰: قطعه ابتدایی به طول ۷۲۱ جفت باز

Figure 2- Agarose electrophoresis of different PCR products from 3’UTR of MSTN gene in native Iranian sheep. M: DNA size marker, lanes 1-4: the third fragment with length of 1058 bp, lanes 5-7: the middle fragment with length of 635 bp and lanes 8-10: the first fragment with length of 721 bp.



شکل ۲– مقایسه بخشی از توالی 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند تکسل که حاوی آلل جهش یافته A می‌باشد و گوسفندان بومی این مطالعه که دارای آلل طبیعی G می-باشند.

Figure 2- Comparison of partial 3 'UTR sequence of myostatin gene in Texel sheep containing mutant allele A and indigenous sheep breeds in this study with natural G allele.



شکل۳– جایگاه‌های هدف پیش‌بینی‌شده برای اتصال miR-1 و miR-206 در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین گوسفندان بومی این مطالعه

Figure 3- Predicted target sites for binding miR-1 and miR-206 in the 3'UTR of myostatin gene in studied indigenous sheep.

نتیجه‌گیری کلی

نتیجه حاصل از این تحقیق نشان داد که نژادهای دالاق، بلوچی و زل فاقد جهش افزایش‌دهنده رشد عضله در ژن میوستاتین g+6723G>A می‌باشند و همه نمونه‌ها دارای آلل طبیعی G می-باشند. همچنین مقایسه توالی مرجع با توالی 3' UTR ژن میوستاتین گوسفندان زل، بلوچی و دالاق شباهت بسیار بالایی را نشان داد. نتایج حاصل از تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد که با ایجاد جایگاه هدف برای miR-1 و miR-206 به‌صورت *in silico* در 3' UTR ژن میوستاتین نژادهای موردمطالعه اثر دیگری غیر از ایجاد فنوتیپ عضله مضاعف نخواهد داشت. بنابراین از این مطالعه می‌توان به‌عنوان مرحله

مقدماتی در طراحی آزمایشات بعدی که منجر به تولید سلول و نهایتاً حیوان تراریخت خواهند شد، استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تحت گرنت شماره ۳/۳۹۵۸۷ انجام گرفت.

منابع

1- Abbasi, V., A. Javadmanesh, and M. Nassiry. 2016. Prediction and *in silico* validation of expressed micro- RNAs in ovine chromosomes 20. Proceedings of The 2nd International and The 14th Iranian Genetics Congress. 21-23 May, Tehran, Iran. (In Persian).
2- Aslaminejad, A. A. Nassiry, M. R. Shahroudi, F. E. Valizadeh, R. Javadmanesh, A. Norouzy, A. Samei, A. and Ghiasi, H. 2006. Study on the genetic polymorphisms of candidate genes in Karakul. Agricultural Sciences and Technology 20 (4): Pe21-Pe29. (In Persian).
3- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function: a review. Cell, 116: 281–297.
4- Bartel, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory Functions. A review. Cell, 136: 215–233.
5- Bellinge, R. H., D. A. Liberles, S. P. Iaschi, and P. A. O'Brien. 2005. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. Animal Genetics, 36: 1-6.
6- Boman, I. A., G. Klemetsdal, O. Nafstad, T. Blichfeldt, and D. I. Våge. 2010. Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). Genetics Selection Evolution, 42: 4.
7- Chen, J. F; M. M. Elizabeth, J. M. Thomson, Q. Wu, T. E. Callis, S. M. Hammond, F. L. Conlon, D. Z. Wang. 2005. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nature Genetics, 38: 228-233.
8- Chris P., D. F. Carlson, R. Huddart, C. R. Long, J. H. Pryor, T. J. King, S. G. Lillico, A. J. Mileham, D. G. McLaren, C. B. A. Whitelaw, and S. C. Fahrenkrug. 2015. Genome edited sheep and cattle. Transgenic Research, 24: 147-153.
9- Clop, A., F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, X. Tordoir, B. Bibe, J. Bouix, F. Caiment, J. M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, J. Tobin, and C. M. Charlier. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nature Genetics, 38: 813-818.
10- Gonzalez-C. N., W. E. Taylor, K. E. Yarasheski, I. Sinha- Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver, and S. Bhasin. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 14938–14943.
11- Grisolia, A. B., G.T. D'Angelo, L. R. Porto Neto, and F. Siqueira. 2009. Myostatin (GDF8) single nucleotide polymorphisms in Nellore cattle. Genetics and Molecular Research, 8: 822-830.
12- Hadjipavlou, G., O. Matika, A. Clop, and S. C. Bishop. 2008. Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. Animal Genetics, 39: 346–353.
13- Heravi Mousavi, A., M. Ahouei, M.R. Nassiry and A. Javadmanesh. 2006. Association of leptin polymorphism with production, reproduction and plasma glucose level in Iranian Holstein cows. Asian Australian Journal of Animal Sciences. 19 (5): 627-631.
14- Javadmanesh, A. 2013. Contribution of IGF system and GH-IGF1 axis to heterosis in a bovine fetus model. PhD thesis. The University of Adelaide, Adelaide, Australia.
15- Javadmanesh, A., M. R. Nassiry, and M. Azghandi. 2017. Sequencing of HVR-III region of mtDNA in Iranian sheep breeds. Journal of Animal Science Researches, 27 (2): 133-141. (In Persian).
16- Lillico, S. G., C. Proudfoot, D. F. Carlson, D. Stverakova, C. Neil, C. Blain, T. J. King, W. A. Ritchie, W. Tan, A. J. Mileham, D. G. McLaren, S. C. Fahrenkrug, and C. B. A. Whitelaw. 2013. Live pigs produced from genome edited zygotes. Scientific Reports, 3: 2847.
17- Lv, Q., L. Yuan, J. Deng, M. Chen, Y. Wang, J. Zeng, Z. Li, and L.Lai, 2016. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. Scientific Reports, 6: 25029.
18- McPherron, A, and S. J. Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 12457–12461.
19- McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature, 387: 83–90.
20- Miar, Y., R. Salehi, S. A. Aleyasi, D. Kolbehdari, and S. Raoofzadeh. 2009. Polymorphisms in Myostatin Gene

and its Association with Growth and Carcass Traits in Iranian Sheep. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. (In Persian).

21- Nassiry, M. R., M. Tahmoorespur, A. Javadmanesh, M. Soltani, and S. Foroutanifar. 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. Iranian Journal of Biotechnology 4 (3): 188-192.

22- Nassiry, M. R., F. Eftekhari Shahroudi, M. Tahmoorespur and A. Javadmanesh. 2008. The diversity of BoLA-DRB3 gene in Iranian native cattle. Asian Australian Journal of Animal Sciences. 21 (4): 456-470.

23- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A Scott, and F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols, 8: 2281-2308.

24- Rhoades, M. W., B. J. Reinhart, L.P. Lim, C. B. Burge, B. Bartel, and D. P. Bartel. 2002. Prediction of Plant MicroRNA Targets. Cell, 110: 513–520.

25- Tang, D. Z., H. J. Wu, H. Chen, Y. Zhang, X. Zhao, X. Chen, W. Du, D. Wang, and X. Lin. 2012. Silencing myostatin gene by RNAi in sheep embryos. Journal of Biotechnology, 158: 69–74.

26- Taylor, W. E., S. Bhasin, J. A. Frances Byhower, M. Azam, H. Darril, J. r. Willard, F. C. Kull, and N. Gonzalez-Cadav. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 280: E221–E228.

27- Warner, R. D., P. L. Greenwood, and D. M. Ferguson. 2011. Understanding genetic and environmental effects for assurance of meat quality. Control of Meat Quality, 117-145.

28- Yousefi, A. R., Kohram, H. Zare Shahneh, A. Nik-khah, A. and Campbell, A. W. 2012. Comparison of the meat quality and fatty acid composition of traditional fat-tailed (Chall) and tailed (Zel) Iranian sheep breeds. Meat Science. 92 (4): 417-422.

29- Zhang, Z. J., Y.H. Ling, L. J. Wang, Y. F. Hang, X. F. Guo, Y. H. Zhang, J. P. Ding, and X. R. Zhang. 2013. Polymorphisms of the myostatin gene (*MSTN*) and its relationship with growth traits in goat breeds. Genetics and Molecular Research, 12: 965-971.

30- Zheng, Y., H. Ma, Y. Zheng, Y. Wang, B. Zhang, X. He, X. He, J. Liu, and Y. Zhang. 2012. Site-directed mutagenesis of the myostatin gene in ovine fetal myoblast cells in vitro. Research in Veterinary Science. 93 (2): 763-769.

31- Zou, Q., X. Wang, Y. Liu, Z. Ouyang, H. Long, S. Wei, J. Xin, B. Zhao, S. Lai, J. Shen, Q. Ni, H. Yang, H. Zhong, L. Li, M. Hu, Q. Zhang, Z. Zhou, J. He, Q. Yan, N. Fan, Y. Zhao, Z. Liu, L. Guo, J. Huang, G. Zhang, J. Ying, L. Lai, X. Gao. 2015. Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. Journal of Molecular Cell Biology. 7 (6): 580-583.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 1, Spring 2019, p. 111-119

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۱۱۹-۱۱۱

Sequencing and Bioinformatic Investigation of Introducing a Repressive Micro-RNA Target Sites in the 3'UTR of Myostatin Gene in some Indigenous Sheep Breeds of Iran

S. Soleimani[1]- M. H. Sekhavati[2]- A. Javadmanesh[2]*

Received: 2017/07/10
Accepted: 2018/09/06

Introduction Myostatin, known as the growth and differentiation factor 8 (GDF8), is a negative regulator of skeletal muscle growth in mammals. This gene is conserved across mammalian species and expressed in developing as well as mature skeletal muscles fiber cells. It has been demonstrated that a natural mutation in myostatin (MSTN) gene is effective in muscle tissue overgrowth in species such as cattle, sheep, pig and mouse. Later on, with administration of genome editing techniques on rabbit (17), pig (16) and dog (31), double muscling trait was successfully achieved by modifying MSTN gene. It can be inferred from the studies that the removal of MSTN's inhibitory role will leads to muscle increase, an observation similar to that of other mammalian species. Therefore, it can be considered as a candidate gene for growth and carcass traits. This simple mutation can be used as a model for genetic engineering of farm animals to improve growth traits.

Materials and Methods In total, blood samples of 15 sheep from each breed of Dalagh, Baluchi and Zel were collected. Genomic DNA was extracted from whole blood using Guanidium Thiocyanate-Silica Gel method (Diatom DNA Prep. 100, Isogene, Russia) following the manufacturer's instruction. The integrity of the extracted DNA was assessed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and the purity of the obtained DNA was evaluated by Epoch microplate spectrophotometer (BioTek, USA). A 2180 bp region from 3UTR of ovine MSTN gene was amplified by standard PCR reaction in a total volume of 25 µl. Tree sets of specific overlapping primers were used to amplify part of the 3UTR region in MSTN gene (Table 1). The PCR products then purified by ethanol precipitation method (14) and sequenced. The sequencing results homology were checked by BLAST and assembled using CLC sequence viewer 8.0. Then miRNA target sites were analyzed to create a potent *in silico* modification which serve as a target site for the microRNAs miR-1 and miR-206 with suppressing effect on MSTN transcript. At the end to assess the formation of any new and undesired motif due to the creation of our *in silico* modification, the whole area analyzed with the motif finder application.

Results and Discussion This study was performed to identify and compare DNA sequence of a 2180 bp region from the 3'UTR of myostatin gene in Dalagh, Baluchi and Zel sheep breeds and with the aim of introducing an *in silico* modification to introduce a mutation with a positive impact on growth rate. Results showed that there was a high similarity between 3' UTR sequences of GDF8 gene in Zel, Dalagh and Baluchi sheep breeds. All samples were monomorphic and had the g+6723G allele, which do not cause double muscle phenotype (Figure 2). An *in silico* approach employed to modify the 3'UTR of the myostatin gene in this indigenous sheep breeds in order to create miR-1 and miR-206 (ACATTCCA) target sequences naturally occurring in the Texel sheep (Figure 3). After applying these changes, the possibility of creating unwanted new regulatory elements was investigated using the motif finder software. The results showed that the introduced mutations did not create any new motifs that had a known regulatory role in mammals. It was demonstrated that this mutation can attribute to 38% of the additive genetic variance for muscle depth in the Charollais lambs (12). In another study, this mutation found to have a significant increase in muscle mass and reduced carcass fat in Norwegian White sheep (6). Therefore, this single modification can be considered as the best mutation for double muscling due to its large effect on the muscling phenotype.

Conclusion Due to the large effect that g+6723G>A mutation has on the phenotype double muscle and also the absence of other known effects on the phenotypes, this mutation could be considered as one of the best candidates for genome editing that can create indigenous sheep with overgrown muscle phenotype in the future by using of genetic engineering techniques. It is feasible to introduce this mutated allele by genetic engineering

---

1 and 2- M.Sc. Graduate and Assistant Professors, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*-Corresponding Author Email: javadmanesh@um.ac.ir)

methods as a desirable genetic modification for improving indigenous sheep breeds. Advantages of using this approach include increasing the genetic progress of breeding programs in compare to traditional methods and maintaining the environmental compatibility of indigenous sheep breeds.

Keywords: Muscle tissue, Sheep, Myostatin, Micro RNA.